

マウス脾細胞でのインターフェロン誘起に対する A 群溶連菌の影響

金沢大学医学部整形外科科学教室 (主任: 野村 進教授)

池 田 周 紹

(昭和58年3月25日受付)

本研究は溶連菌におけるストレプトリジン S (Streptolysin S, SLS) 産生能とインターフェロン (IFN) 誘起能との関連性を調べるために行った。用いた菌株は抗腫瘍性で SLS 産生能を有する C 203 S 株, Blackmore 株と Su 株, ならびに抗腫瘍能と SLS 産生能を欠く C 203 U 株であった。これらの溶連菌の凍結乾燥標品は OK-432 の作製過程によって得られた。即ちペニシリン G 含有 Bernheimer's basal medium に各菌を浮遊させて 37°C 20 分間, ついで 45°C 30 分間静置した後凍結乾燥した。これら標品の BALB/c マウス脾細胞における IFN 誘起活性測定は L 929 細胞と vesicular stomatitis virus を用いて行った。その結果, C 203 S, C 203 U, Blackmore 菌の各標品は何れも IFN を Su 菌標品である OK-432 と同様に誘起した。また各誘起 IFN の活性間には差がみられなかった。加熱死菌を用いると, Su 菌以外の加熱死菌には IFN 誘起作用はなかった。最も活性の強い IFN は 1×10^7 個/ml の脾細胞浮遊液 1 ml と, 0.5 または 0.1 KE/ml 濃度の菌標品浮遊液 0.1 ml の混合液を 5% CO₂ 培養器に 37°C で 24 時間から 48 時間培養することで得られた。なお 1 KE は乾燥菌 0.1 mg に相当する。誘起 IFN を pH 2 下に 3 時間置くと IFN 活性は完全に失活したが, OK-432 誘起 IFN のみは低活性 (10 U/ml) を保持していた。しかし, 誘起 IFN 活性は抗 IFN- $\alpha \cdot \beta$ 血清による中和試験により部分的に中和され, 60% 以上の活性が残存していた。このことより菌標品による誘起 IFN は IFN- α , β および γ より成ると考えられた。

Key words Hemolytic streptococci, OK-432, Interferon, Anti interferon $\alpha \cdot \beta$ serum.

酵母リボ核酸による溶連菌溶血毒素の増産効果 (核酸効果)¹⁾²⁾の研究に端を発して行われた溶連菌の制がんに関する実験的研究³⁾から, 岡本らは溶連菌 Su 株 (以下 Su 菌と略記) にペニシリン G を加えて温度処理することで PC-B-45⁴⁾⁵⁾ (OK-431) を開発し, その凍結乾燥標品 OK-432⁶⁾は制がん剤として臨床に, 研究に用いられている。OK-432 の制がん作用機序に関しては直接作用としての腫瘍細胞傷害作用⁷⁾のほか, 宿主介在作用としてインターフェロン^{8)~10)} (Interferon, 以下 IFN と略記) 誘起, マクロファージ¹¹⁾¹²⁾, Natural killer 細胞の活性化¹³⁾などが報告されている。

一方これまでの実験から溶連菌による制がん効果は, ストレプトリジン S (Streptolysin S, 以下 SLS と略記) 産生能を有する溶連菌のみに認められ, ストレプトリジン O (Streptolysin O, 以下 SLO と略記)

を産生しても SLS を産生しない溶連菌には認められないことが実証¹⁴⁾されている。これらのことより本論文では各種溶連菌を用いて IFN 誘起に対する影響について検討を行うと共に, 誘起 IFN の性状についても検討を行った。

材料および方法

1. 溶連菌株

金沢大学医学部薬理学教室保存の菌株を用いた。

1) 溶連菌 C 203 S 株 (Type 3, SLS と SLO を産生, 以下 C 203 S 菌と略記)

2) 溶連菌 C 203 U 株 (C 203 S 菌の変異株, SLO のみを産生, 以下 C 203 U 菌と略記)

3) 溶連菌 Blackmore 株 (Type 11, SLS のみを産生, 以下 Blackmore 菌と略記)

Effect of hemolytic streptococci on induction of interferon in mouse spleen cells. Shu-sho Ikeda, Department of Orthopedic Surgery, (Director: Prof. S. Nomura), School of Medicine, Kanazawa University.

4) 溶連菌 Su 株 (Type 3, ATCC 21060, SLS および SLO を産生, 以下 Su 菌と略記)

上記各菌の継代培養には普通ブイヨン培地 (pH 7.4) を用いた。

2. 溶連菌標品の作製

Su 菌の OK-432 は Okamoto ら^{4)~6)}の方法によって作製した。すなわち、Su 菌の 20 時間普通ブイヨン培養液 1 ml を 100 ml 普通ブイヨンに接種し、37°C 20 時間培養した後低温で遠心し、沈殿した生菌体を冷生理食塩水 (以下 PSS と略記) 40 ml で 2 回洗浄した。ついで洗浄菌体を 5 ml Bernheimer's basal medium¹⁵⁾ (Maltose 675 mg, 20% KH_2PO_4 (NaOH で pH 7 に調製) 6 ml, 2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 12 ml, 蒸留水 66 ml) に浮遊した。次いで菌浮遊液に $1.6 \times 10^8 \text{U/ml}$ のペニシリン G (明治製菓) 生理食塩水 1 ml を加え、37°C 20 分間に続いて 45°C 30 分間静置し、同処理液にさらに 1% DL-メチオニン-ペニシリン G ($1.08 \times 10^8 \text{U/ml}$) 液 6 ml を添加して凍結乾燥を行って Su 菌標品 OK-432 を作製した。

C 203 S 菌、C 203 U 菌および Blackmore 菌についても同様な処理を行い、得られた標品をそれぞれ C 203 S 標品、C 203 U 標品および Blackmore 標品とした。これら各標品は使用直前に phosphate-buffered saline (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, CaCl_2 0.1 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g を蒸留水に溶解し 1 l とする。pH 7.3, 以下 PBS と略記) に溶解して用いた。各菌標品の濃度は KE (菌量の単位で、1 KE は乾燥菌 0.1 mg に相当) で表示した。因みに 100 ml のブイヨン培養液より得られる Su 菌量は 100 KE であった。

3. 加熱死菌の作製

各菌液 0.5 ml を普通ブイヨン 50 ml に接種して 37°C で 20 時間培養した後、低温で遠心 (5,000 rpm, 15 分間) し、生じた沈殿生菌体を PSS で 2 回洗浄した後、洗浄菌体に 3 ml の PSS を加えて 100°C 60 分間加熱処理を行った。この加熱処理浮遊液の菌体量は 50 KE/3 ml であり、実験には使用直前に PBS で希釈して用いた。

4. 実験動物

BALB/c および BALB/c (nu/nu) マウス (雄, 6 週齢) を使用した。

5. マウス脾細胞の作製

脾細胞浮遊液の作製は Shirahata ら¹⁶⁾の方法に準じて行った。すなわち、マウス 5 匹を一群として屠殺した後無菌的に摘出した脾臓をプラスチックシャーレ中のミニマム・エッセンシャル・メディア (日水製薬, 以下 MEM と略記) 液 3 ml に置き、1 ml ツベルクリン注射筒先端を用いて破碎した後、新たに 7

ml MEM 液を加えて脾細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液を金属メッシュで濾過し結合組織を除去した後、遠心 (900 rpm, 5 分間) し、沈殿物を 10 ml の MEM 液を用いて 2 回洗浄した。洗浄沈殿物を 2 ml の MEM 液と Red cell lysing buffer (NH_4Cl 0.829 g, KHCO_3 0.1 g, EDTA 0.367 g, 1 N NaOH 2.5 ml, 蒸留水 100 ml, pH 7.4) 4 ml の混合液に浮遊させて充分攪拌し、約 3 分間静置することにより赤血球を溶血させた後、さらに MEM 液 8 ml を添加し、遠心 (900 rpm, 5 分間) 後上清液を吸引除去した。生じた沈渣を 8 ml の MEM 液で 3 回洗浄・遠心した後、適量の 5% 牛胎児血清 (GIBCO, 以下 FCS と略記) 加 RPMI 1640 (日水製薬) に浮遊させ、生存脾細胞の数を 0.4% トリパンプルー (Merk) による dye-exclusion test により判定した後、さらに 5% FCS 加 RPMI 1640 液を加えて 1×10^7 個/ml の脾細胞浮遊液を作製した。実験には 5% FCS 加 RPMI 1640 液で希釈した脾細胞浮遊液を用いた。

6. 酢酸ハイドロコルチゾン前処理 BALB/c マウス脾細胞の作製

酢酸ハイドロコルチゾン (日本メルク 萬有) 6.25, 12.5, 25 mg/匹を各 BALB/c マウスに皮下接種し、4 日目に屠殺後無菌的に脾臓を摘出して、前述した方法に従って脾細胞を調整した。

7. 担がん BALB/c マウス脾細胞の作製

エーリッヒ腹水がん細胞浮遊液 (1×10^7 個/ml) 0.2 ml をマウス腹腔内に接種し、10 日目に屠殺して無菌的に摘出した脾臓を、PBS で洗浄してがん細胞を除去した後、前述した方法に従って脾細胞浮遊液を作製した。

8. 培養マウス脾細胞からの IFN 誘起実験

各濃度の脾細胞浮遊液に各種濃度の各菌浮遊液を加えて、37°C 下炭酸ガス培養液 (炭酸ガス濃度 5%) で培養し、経時的に培養上清液を採取し、IFN 測定時まで -20°C に冷凍保存した。

9. IFN の測定法

東北大学医学部細菌学教室より供与された L 929 細胞および vesicular stomatitis virus (インディアナ株, 以下 VSV と略記) を用い、Brodeur¹⁷⁾ および Koi ら¹⁸⁾の方法に従い前記培養上清中の IFN 活性を測定した。すなわち、7.5% 仔牛血清 (GIBCO) 加 MEM 液を用いて倍々希釈した培養上清液の各希釈液 50 μl をマイクロプレート (96 穴, Corning) の各ウェルに注入し、これに L 929 細胞浮遊液 (1.5×10^6 個/ml) 50 μl を加えて 37°C の炭酸ガス培養器 (炭酸ガス濃度 5%) で 24 時間培養した。培養後上清液をパスツールピペットで吸引除去した後、各ウェルの L 929 細胞を PBS 0.3 ml

で洗浄し、これに VSV 溶液 (MEM 液で希釈, 40 plaque forming units/50 μ l) を添加し、これを炭酸ガス培養器に静置した。1 時間後 VSV 培養液を吸引除去した後、1.5% メチルセルロース (半井化学) 加 1.5% FCS 加 MEM 液 50 μ l を重層し、炭酸ガス培養器で 24 時間培養した。培養後重層培地を吸引除去したマイクロプレートを用い、1% クリスタルバイオレット (Merck) 加エチルアルコールに浸し、15 分間染色固定した。ついで水洗を行いブランク数を求めた。対照として菌標品無添加 L 929 細胞のブランク数を用い、50% ブランク阻止法により IFN 活性値を算出した。なお測定に際し、NIH 標準マウス IFN (No.022-904-511) も同時に測定し、本実験系により求めた IFN 活性値を国際単位と比較した。その結果本実験系における 1 単位は約 1 単位の国際単位に相当した。

10. 誘起 IFN の pH 2 における安定性試験

Welsh¹⁹⁾ の手技に準じて行った。誘起 IFN 溶液 (pH 7.1) 1 ml に 0.1 N HCl を加えて pH 2.0 に調整し、37°C で 3 時間静置した。静置後誘起 IFN 溶液の pH を 0.1 N NaOH により pH 7.0 に修正した後、メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m, Millipore) によ

り除菌し、汙液について IFN 測定を行った。

11. 誘起 IFN の中和試験

被験誘起 IFN 溶液 50 μ l に抗 IFN- $\alpha \cdot \beta$ 血清 (NIH No. G 024-501-568, 中和力価 250 U/ml に希釈, 東北大学医学部細菌学教室より供与) 50 μ l を添加し、4°C 下で 60 分間静置後、残存 IFN 活性を測定した。なお pH 2 における安定性試験および中和試験には対照 IFN としてコンカナバリン (Con A, Sigma) を脾細胞培養液に添加する事により得られた IFN 溶液 (IFN- γ) を用いた。

成 績

I. IFN 誘起実験

1. 各種菌標品による BALB/c マウス脾細胞での IFN 誘起実験

4×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 および 1×10^7 個/ml の各脾細胞浮遊液 1 ml にそれぞれ 0.1, 0.5, 2.5 および 12.5 KE/ml の各種菌標品を 0.1 ml 添加し、4, 8, 12, 24, 48 時間培養後上清液中の IFN 活性を測定した。その結果、脾細胞数が 4×10^5 個/ml の浮遊液に菌標品を加えても各菌標品のいずれの濃度および培養時間におい

Table 1. Effect of preparations* of different hemolytic streptococcus strains on the induction of IFN in 2×10^6 BALB/c mouse spleen cells per ml

Coccal preparation	Concentration of coccal preparation in the mixture (KE**/ml)	Activity of IFN (U/ml) induced during incubation time of				
		4	8	12	24	48 hr
C203S	0.01	—***	—	—	42	52
	0.05	—	—	—	39	42
	0.25	—	—	—	20	24
	1.25	—	—	—	—	—
C203U	0.01	—	—	—	29	30
	0.05	—	—	19	37	34
	0.25	—	—	—	20	26
	1.25	—	—	—	—	—
Blackmore	0.01	—	—	22	80	70
	0.05	—	—	21	72	74
	0.25	—	—	—	45	40
	1.25	—	—	—	—	—
Su (OK-432)	0.01	—	—	18	40	36
	0.05	—	—	26	48	39
	0.25	—	—	—	18	24
	1.25	—	—	—	—	—
PBS (Control)	0	—	—	—	—	—

A mixture of 1 ml of spleen cell suspension (2×10^6 cells/ml) and 0.1 ml of suspension of coccal preparation was incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C. After incubation, activity of induced IFN was assayed.

* Preparation of hemolytic streptococci: coccal suspension of C203S, C203U and Blackmore in Bernheimer's basal medium containing penicillin G (2.7×10^4 U/ml) was incubated at 37°C for 20 minutes followed by incubation at 45°C for 30 minutes and lyophilized.

** KE: One KE corresponds to 0.1 mg dried cocci.

***: Less than 16 U/ml.

でも IFN 活性は認められなかった。しかし、脾細胞が 2×10^6 個/ml の浮遊液に菌標品を作用させると IFN が認められ、その成績は表 1 に示した如くである。すなわち、8 時間以内の培養では全ての菌標品において IFN 活性は認められなかったが、培養 24, 48 時間では全ての菌標品において IFN 活性は認められ、かつその作用濃度が 0.01 および 0.05 KE/ml の低濃度ほど IFN の活性は強く、1.25 KE/ml の高濃度では IFN 活性は認められなかった。各菌標品による IFN 活性の最高値は C 203 S 標品で 52 U/ml, C 203 U 標品で 37 U/ml, Blackmore 標品で 80 U/ml, および OK-432 で 48 U/ml と一般に低かった。

脾細胞数 5×10^6 個/ml の浮遊液に菌標品を作用させた実験成績は表 2 に示した。菌標品濃度が 1.25 KE/ml で IFN 誘起が認められぬのは先の実験と同じであったが、低濃度では全ての菌標品において 8 時間以上の培養で IFN 誘起が認められ、殊に 24 および 48 時間培養で IFN 活性は強かった。また各標品の最高値は C 203 S 標品で 107 U/ml, C 203 U 標品で 107 U/ml, Blackmore 標品で 111 U/ml, OK-432 では 137 U/ml であり、何れも 2×10^6 個/ml 脾細胞浮遊液に対するよりも IFN 誘起は高まっていた。しかし、各菌標品間においては著しい差異は認められなかった。

脾細胞数 1×10^7 個/ml の浮遊液を用いた場合の実験成績は表 3 に示した如くである。IFN 誘起は菌標品

作用濃度が 1.25 KE/ml では認められず、低濃度で強く認められることは先の実験と同様であった。また、IFN 活性は培養時間が 24, 48 時間で最も強く、各菌標品の活性最高値は C 203 S 標品で 140 U/ml, C 203 U 標品で 158 U/ml, Blackmore 標品で 230 U/ml, および OK-432 で 203 U/ml であり、Blackmore 標品および OK-432 に強くみられた。また、先の実験と比較して、脾細胞の数が多いほど IFN 活性が強いことも認められた。

以上の成績から誘起 IFN 活性を菌標品ごとに示したのが図 1, 2, 3 および 4 である。これよりみられる如く、活性値が最も高いのは脾細胞数が 1×10^7 個/ml であり、標品作用濃度が 0.05 KE/ml であることから (Blackmore 標品のみ 0.01 KE/ml), 以下の実験はこの条件によって行った。

2. 加熱死菌による BALB/c マウス脾細胞での IFN 誘起実験

BALB/c マウス脾細胞浮遊液 (1×10^7 個/ml) 1 ml に C 203 S, C 203 U, Blackmore, Su 菌の加熱処理死菌浮遊液を作用濃度 0.05 KE/ml になる様に添加して 37°C 下に培養し、12, 24, 48 時間後に IFN 活性を測定した。その成績は表 4 に示した。IFN 活性は Su 菌の加熱死菌を添加した場合にのみ認められ、IFN 活性も先の実験と同様に 24 時間培養で最高値を示したが、その活性は 52 U/ml と OK-432 よりかなり低かった。

Table 2. Effect of coccal preparations* on the induction of IFN in 5×10^6 BALB/c mouse spleen cells per ml

Coccal preparation	Concentration of coccal preparation in the mixture (KE**/ml)	Activity of IFN (U/ml) induced during incubation time of				
		4	8	12	24	48 hr
C203S	0.01	—***	32	40	79	107
	0.05	—	18	32	75	74
	0.25	—	16	20	32	42
	1.25	—	—	—	—	—
C203U	0.01	—	21	47	84	87
	0.05	—	28	50	79	107
	0.25	—	17	24	39	50
	1.25	—	—	—	—	—
Blackmore	0.01	—	39	60	111	104
	0.05	—	30	56	91	69
	0.25	—	19	24	37	45
	1.25	—	—	—	—	—
Su (OK-432)	0.01	—	28	40	97	111
	0.05	—	22	36	137	134
	0.25	—	24	26	47	37
	1.25	—	—	—	—	—
PBS (Control)	0	—	—	—	—	—

*, **, ***: Refer to footnotes of Table 1.

Table 3. Effect of coccal preparations* on the induction of IFN in 1×10^7 BALB/c mouse spleen cells per ml

Coccal preparation	Concentration of coccal preparation in the mixture (KE**/ml)	Activity of IFN (U/ml) induced during incubation time of				
		4	8	12	24	48 hr
C203S	0.01	—***	50	66	128	111
	0.05	—	45	74	137	140
	0.25	—	32	45	97	49
	1.25	—	—	—	—	—
C203U	0.01	—	42	49	88	104
	0.05	—	60	64	158	126
	0.25	—	28	40	84	119
	1.25	—	—	—	—	—
Blackmore	0.01	—	70	104	230	181
	0.05	—	84	91	223	157
	0.25	—	46	60	137	147
	1.25	—	—	—	—	—
Su (OK-432)	0.01	—	39	80	119	119
	0.05	—	56	137	203	181
	0.25	—	30	42	90	97
	1.25	—	—	—	—	—
PBS (Control)	0	—	—	—	—	—

*, **, ***, : Refer to footnotes of Table 1.

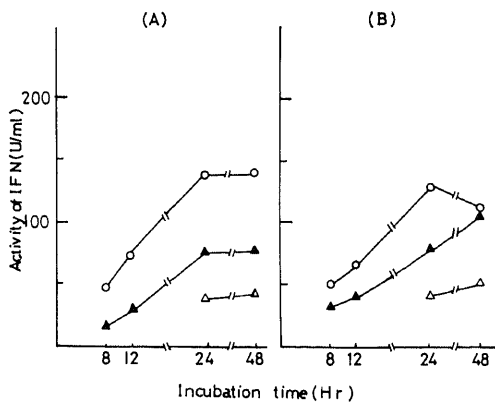
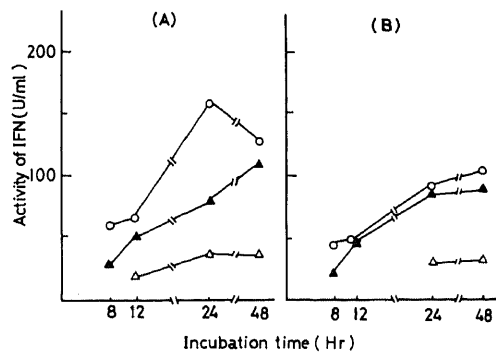
Fig. 1. Activity of IFN induced by C203S preparation. A mixture of 1 ml of spleen cell suspension and 0.1 ml of suspension of lyophilized coccal preparation was incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C. After incubation, activity of induced IFN was assayed. Spleen cell suspension: 2×10^6 cell/ml, \triangle ; 5×10^6 cell/ml, \blacktriangle ; 1×10^7 cells/ml, \circ . Concentration of coccal preparation in a mixture: 0.05 KE/ml, (A); 0.01 KE/ml, (B).

Fig. 2. Activity of IFN induced by C203U preparation. Refer to footnote of Fig. 1.

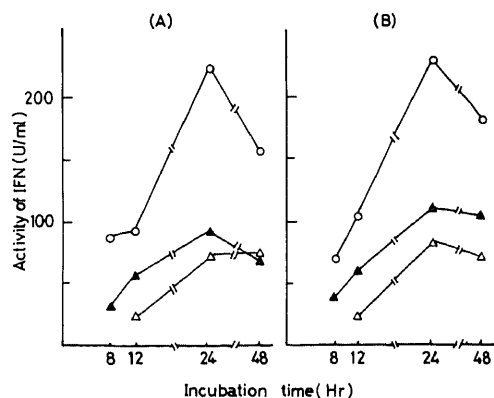


Fig. 3. Activity of IFN induced by Blackmore preparation. Refer to footnote of Fig. 1.

での IFN 誘起実験

BALB/c (nu/nu) マウス脾細胞浮遊液 (1×10^7 個/ml) 1 ml に各種菌標品 (0.5 KE/ml) 0.1 ml を添加し、

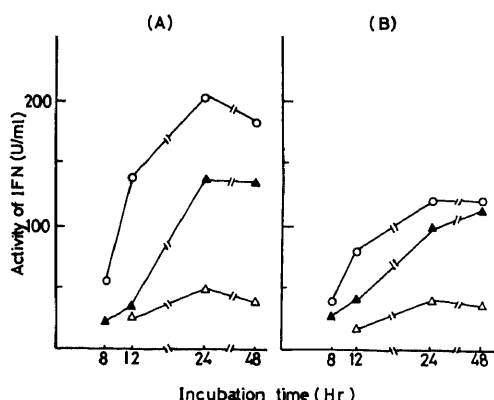


Fig. 4. Activity of IFN induced by Su preparation (OK-432). Refer to footnote of Fig. 1.

Table 4. Effect of heat-killed hemolytic streptococci* cells on the induction of IFN in BALB/c mouse spleen cells

Heat-killed cocci	Activity of IFN (U/ml) induced during incubation time of		
	12	24	48 hr
C203S	—**	—	—
C203U	—	—	—
Blackmore	—	—	—
Su	32	52	49

A mixture of 1 ml of the spleen cell suspension (1×10^7 cells/ml) and 0.1 ml of heat-killed cocci suspension (0.5 KE/ml) was incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C. After incubation, activity of induced IFN was assayed.

* : Cocci harvested from 50 ml of ordinary broth culture was suspended in 3 ml of physiological saline, and heated at 100°C for 60 minutes.

** : Less than 8 U/ml.

Table 5. Effect of coccal preparations on the induction of IFN in BALB/c (nu/nu) mouse spleen cells

Coccal preparation	Activity of IFN (U/ml) induced during incubation time of	
	24	48 hr
C203S	60	56
C203U	66	72
Blackmore	62	65
Su (OK-432)	56	56

A mixture of 1 ml of the spleen cell suspension (1×10^7 cells/ml) and 0.1 ml of suspension of coccal preparation (0.5 KE/ml) was incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C.

3. 菌標品による BALB/c (nu/nu) マウス脾細胞 37°C の炭酸ガス培養器で 24, 48 時間培養後に IFN 活性を測定した。その成績は表 5 に示した如くである。菌標品により IFN は誘起されたが、その値は BALB/c マウスを用いたよりも低く 45% 以下であった。

4. 菌標品による酢酸ハイドロコルチゾン前処理

BALB/c マウス脾細胞での IFN 誘起実験

予め酢酸ハイドロコルチゾンの前投与 (6.25, 12.5 および 25 mg/匹, s.c.) しておいた BALB/c マウス脾細胞浮遊液 (1×10^7 個/ml) に菌標品 (0.5 KE/ml) 0.1 ml を加えて炭酸ガス培養器で培養し、24, 48, 72 時間後に IFN 活性を測定したが、いずれの前処置マウスの脾細胞からも IFN の誘起を認めなかった。

5. 菌標品による担がん BALB/c マウス脾細胞での IFN 誘起実験

担がん BALB/c マウスの脾細胞浮遊液 (1×10^7 個/ml) 1 ml に各菌標品 (0.5 KE/ml) 0.1 ml を添加し、

Table 6. Effect of coccal preparations on the induction of IFN in spleen cell of Ehrlich carcinoma bearing BALB/c mouse

Coccal preparation	Activity of IFN (U/ml) induced during incubation time of	
	12	24 hr
C203S	11	12
C203U	13	24
Blackmore	12	23
Su (OK-432)	12	23

A mixture of 1 ml of the spleen cell suspension (1×10^7 cells/ml) and 0.1 ml of suspension of coccal preparation (0.5 KE/ml) was incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C.

炭酸ガス培養器で12, 24時間培養後にIFN活性を測定した。その成績は表6に示した通りである。IFNは全ての菌標品により誘起されるが、その活性値は非担がんマウスの脾細胞のに比較して低く、24 U/ml以下であり、また各菌標品間においても差異は認められなかった。

II. 誘起IFNの定性試験

1. 誘起IFNのpH2における安定性試験

BALB/c マウス脾細胞 1×10^7 個/ml の細胞浮遊液 2 ml に各菌標品 (0.5 KE/ml) 0.2 ml を添加し、24時間培養して誘起せしめたIFN含有上清液を2分し、一部はそのまま低温下に保存し、一部は0.1 N 塩酸でpHを2.0として37°C下に3時間静置した。ついで両被検液のIFN活性を型の如くにして測定した。なお、対照として脾細胞浮遊液2 ml にIFN- γ 誘起物質²⁰⁾²¹⁾として知られるCon A 5 μ g/ml を0.2 ml 添加して誘起せしめたIFNについても同様な実験を行った。この成績は表7に示した。すなわちCon A誘起IFNがpH2で3時間処理することで、完全に失活したのと同様に、C203S標品、C203U標品およびBlackmore標品による誘起IFNも活性は消失し、OK-432誘起IFNのみが10 U/mlと低活性を保持していた。

2. 誘起IFNの抗IFN- $\alpha \cdot \beta$ 血清による中和試験

前記の如くにして作製した菌標品ならびにCon A誘起IFN液50 μ l に抗IFN- $\alpha \cdot \beta$ 血清50 μ l を加え、4°C60分間静置後行った誘起IFNの活性測定の成

績は表8に示した如くである。

すなわち、Con A誘起IFNは中和試験後でも98%の活性が残存しているのに対し、C203S誘起IFN、C203U誘起IFN、Blackmore誘起IFNおよびOK-432誘起IFNでは活性は低下し、残存活性はそれぞれ76%、61%、87%および72%であった。

考 察

溶連菌の抗腫瘍効果はSLS産生能を有する溶連菌(C203S株、Blackmore株およびSu株)にみられ、SLS産生能を欠くC203U株にはみられぬことがOkamoto¹⁴⁾²²⁾らによって実証されており、また、Su菌より開発されたOK-432は免疫賦活作用を持つ制がん剤²³⁾として臨床に用いられている。OK-432の抗腫瘍効果は腫瘍細胞傷害作用のほか、主に宿主介在作用によるとされ、IFN誘起作用、マクロファージの活性化、NK細胞の活性化などについて多くの研究^{7)~13)24)25)}がなされている。本論文においては、SLS産生能を有し、抗腫瘍作用をもつC203S菌、Blackmore菌とSu菌、およびSLS産生能を欠き抗腫瘍作用を示さぬC203U菌によるIFN誘起作用について実験を行い、産生細胞としてのマウス脾細胞の数、作用菌標品の濃度、脾細胞と菌標品混液の培養時間ならびにマウスについて吟味検討を行った。

その結果、各菌標品にはIFN誘起作用があり、それぞれに適条件があることが認められた。すなわち、産生細胞としての脾細胞については、本実験で 2×10^6 個/ml以上用いた場合にIFN誘起がみられた。これはヒト白血球数 1×10^6 個/ml以下ではウイルス、poly-riboinosinic acid-polyribocytidylic acid (以下 poly I-poly C と略記) + DEAE dextran, phytohemagglu-

Table 7. Stability of induced IFN at pH 2

IFN	Activity of IFN (U/ml)	
	before treatment	after treatment
IFN induced by preparation of		
C203S	137	—*
C203U	158	—
Blackmore	223	—
Su (OK-432)	203	10
IFN induced by Con A	425	—

A mixture of 2 ml of spleen cell suspension (1×10^7 cells/ml) and 0.2 ml of suspension of coccal preparation (0.5 KE/ml) was incubated in 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 hours.

The pH of induced IFN solution was adjusted to 2.0 with 0.1 N HCl and incubated at 37°C. After incubation for 3 hours, the pH was adjusted to 7.0 with 0.1 N NaOH and the residual activity of IFN was assayed.

* : Less than 8 U/ml.

Table 8. Neutralization of induced IFN by anti-IFN- α, β serum

IFN	Activity of IFN (U/ml)	
	before neutralization	after neutralization
IFN induced by preparation of		
C203S	137	104
C203U	158	97
Blackmore	223	194
Su (OK-432)	203	147
IFN induced by Con A	425	416

A mixture of 50 μ l of induced IFN solution and 50 μ l of anti-IFN- $\alpha \cdot \beta$ serum was incubated at 4°C for 60 minutes. After incubation, an activity of IFN was assayed.

tinin(以下 PHA と略記), staphylococcus enterotoxin A, pokeweed mitogen (以下 PWM と略記) で誘起させても IFN 活性を測定出来なかったという報告²⁶⁾, および, DDI マウスでは 5×10^6 個/ml 以下では IFN 誘起が認められないとする海老名の報告²⁷⁾を考えれば, IFN 誘起には一定数以上の産生細胞が必要と考えられる。

IFN 誘起剤としての菌濃度に関しては, 本論文で菌標品が高濃度 (1.25 KE/ml) であれば IFN 誘起を抑制し, 低作用濃度 (0.05~0.01 KE/ml, 乾燥菌量に換算して 0.005~0.001 mg/ml) で誘起された。このことは, ヌードマウス脾細胞では PHA 濃度が 3 乃至 $5 \mu\text{g/ml}$ ²⁸⁾, DDI マウス脾細胞では streptococcus faecalis が $20 \mu\text{g/ml}$ ²⁹⁾の濃度で最も IFN 活性が得られる事, およびヒトリンパ球では staphylococcus enterotoxin B の最高 IFN 誘起濃度は 0.2 乃至 $1 \mu\text{g/ml}$ ³⁰⁾, 末梢血単核細胞では黄色ブドウ球菌蛋白 A の最高 IFN 誘起濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ ³¹⁾, ヒトリンパ球では純性 PHA が $3 \mu\text{g/ml}$ ³²⁾が至適濃度であるとの報告とよく一致している。これに関しては poly I・poly C 濃度が高まるにつれて RNA 合成は低下するとの Margolis³³⁾の報告, ならびに, Flikke³⁴⁾の細胞培養系で poly I・poly C の濃度が高まると細胞増殖が抑制されるという報告との関連が考えられる。培養時間については, 本実験では 24 乃至 48 時間が最適であったが, マウス腎細胞に poly I・poly C の添加では 6 乃至 8 時間培養, マウス腎細胞にニューカッスル病ウイルスの添加では 12 乃至 14 時間培養, L 細胞にニューカッスル病ウイルスあるいは poly I・poly C を加えた場合はいずれも 12 乃至 14 時間培養で最高活性値³⁵⁾を測定している。Saito ら¹⁰⁾は OK-432 を用いたマウス脾細胞培養では 24 時間乃至 48 時間培養で IFN 活性が最高であるとし, streptococcus faecalis を用いたマウス脾細胞培養でも 24 時間乃至 48 時間培養で最高 IFN 活性が得られるとの報告²⁹⁾から, それぞれ至適培養時間があると考えられる。これに比し我々のマウス脾細胞培養系における連鎖球菌誘起最大 IFN 活性は 24 乃至 48 時間培養によって得られる傾向にあると思われる。

本論文では抗腫瘍性および非抗腫瘍性溶連菌共に IFN を誘起したが, ただ加熱死菌を用いた時には Su 菌のみに IFN 誘起がみられた事は興味ある処である。しかしその理由については全く不明であり, 石田ら³⁶⁾はグラム陽性菌の teichoic acid を IFN 誘起の作用基として着目しているが, これのみでは説明がつかず, またこれまで Su 菌に固有な構成, 成分の報告も無い。このことは, 溶連菌の抗腫瘍効果と IFN の関係と共に今後検討すべきであると考えられる。

人末梢血白血球培養で PHA 誘起 IFN は pH 2, 56°C で不活化されたという Wheelock の報告³⁷⁾以来, 人扁桃由来リンパ球培養系での PHA³⁸⁾³⁹⁾, PWM³⁹⁾による IFN はいずれも pH 2 に不安定であり, Youngner ら⁴⁰⁾はこの様な IFN を Type II とし, Valle ら⁴¹⁾は Immune IFN と称した。これに対し pH 2 に安定な IFN は Type I とされ, その後 Type I IFN は IFN- α と IFN- β に, Type II IFN または Immune IFN は IFN- γ とに分類された⁴²⁾。本実験では各菌標品による誘起 IFN は pH 2 処理により残存 IFN 活性が, OK-432 の 10 U/ml を除き, 全て測定出来なかったことより, これら全ての標品はほとんど IFN- γ のみを誘起したと考えられた。しかし抗 IFN- α ・ β 血清で予め処理した後の IFN 残存活性を測定すると, C 203 S 菌標品で 104 U/ml (76%), C 203 U 菌標品で 97 U/ml (61%), Blackmore 菌標品で 194 U/ml (87%), OK-432 で 147 U/ml (72%) の活性を測定し得た。これら残存活性を, potentiation⁴³⁾⁴⁴⁾現象を考慮する必要もあるが, IFN- γ と考えると pH 2 処理後の IFN- γ の活性値より大幅に減少している。このことから, pH 2 による IFN- α および IFN- β と, IFN- γ の決定は十分で無く, また Stewart ら²⁶⁾がヒト IFN- α が pH 2 で不安定であると報告していることから, 必ず抗血清処理も同時に行うことが必要と考えられる。Wakasugi ら⁴⁵⁾は抗 IFN- α 血清を用いることにより人末梢血リンパ球よりの OK-432 誘起 IFN は IFN- α , IFN- γ と考えており, Saito ら¹⁰⁾は抗 IFN 血清を用いてマウス脾細胞よりの OK-432 誘起 IFN は IFN- α , IFN- β , IFN- γ と決定している。しかしマウス IFN の pH 2 と抗 IFN 血清についての詳細な報告は無く, さらに検討が必要である。

結 論

Su 菌より OK-432 を作製する如くにして, 抗腫瘍性で SLS 産生能を有する C 203 S 菌, Su 菌, Blackmore 菌ならびに抗腫瘍性と SLS 産生能を欠く C 203 U 菌を標品化したものを用いて BALB/c マウス脾細胞よりの IFN 誘起に対する影響について実験を行い, また, 誘起 IFN について性状分析を行って次の如き結果を得た。

1. C 203 S, C 203 U および Blackmore 菌標品はどれも OK-432 と同様に IFN を誘起し, 各標品による誘起 IFN の活性間には余り差は認められなかった。しかし,

2. 各菌の加熱死菌による誘起実験では, Su 菌の加熱死菌のみに誘起作用がみられ, その他の加熱死菌には認められなかった。

3. 酢酸ハイドロコルチゾン前投与によりマウス脾細胞からの菌標品による誘起IFN産生は完全に抑制され、また、担がんマウスならびにBALB/c(nu/nu)マウス脾細胞からのIFN誘起も低下していた。

4. 菌標品誘起IFNの性状分析試験では、pH2における安定性試験成績と抗IFN- $\alpha \cdot \beta$ 血清による中和試験成績の間では差は認められたが、誘起IFNのうちほとんどがIFN- γ であり、その他はpH2に不安定な α , β であった。

5. 誘起IFN- γ 活性には各菌標品により差がみられた。

稿を終るに臨み、本研究に終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師野村進教授、ならびに正印達教授に深謝致します。また多大な御助力と御援助を賜った東北大学医学部細菌学教室石田名香雄教授、斎藤元男研究員、青沼悦子研究員に深く謝意を表します。また御協力を頂いた本学医学部微生物学教室中村信一助教授、整形外科学教室富田勝郎講師に深謝致します。

文 献

- 1) Okamoto, H.: Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisin bildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nukleinsäure. I. Mitt. Japan J. Med. Sci., IV. Pharmacology, **12**, 167-208 (1940).
- 2) Okamoto, H., Miura, K., Ito, R. and Kyoda, S.: Über die hochgradige Steigerung des Hämotoxinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nukleinsäure. IIII Mitt. Versuch zur Isolierung von streptolysin aus 1% Nukleinsäure-Buillon-Kultur des Streptococcus haemolyticus. Japan J. Med. Sci., IV. Pharmacology, **13**, 23-34 (1940).
- 3) Okamoto, H., Fujimura, A., Hayashi, T., Nishida, N., Shimizu, R., and Koshimura, S.: Experimental anticancer studies. XX. Effect of live hemolytic streptococci, grown in ribonucleic acid-containing broth, on tumor cells. Gann, **55**, 225-232 (1964).
- 4) Okamoto, H., Minami, M., Shoin, S., Koshimura, S., and Shimizu, R.: Experimental anticancer studies. Part XXXI. on the streptococcal preparation having potent anticancer activity. Japan J. Exp. Med., **36**, 175-186 (1966).
- 5) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S., and Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. Japan J. Microbiol., **11**, 323-336 (1967).
- 6) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S., and Takagaki, Y.: Tumor inhibiting effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). Cancer Chemother. Rep., Part 1, **56**, 9-17 (1972).
- 7) Hojo, H. and Hashimoto, Y.: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcus preparation (OK-432). Gann, **72**, 692-699 (1981).
- 8) Aoki, T., Kvedar, J. P., Hollis, V. W., and Bushar, G. S.: Streptococcus pyogenes preparation OK-432. Immunoprophylactic and immunotherapeutic effect on the incidence of spontaneous leukemia in AKR mice. J. Nat. Cancer Inst., **56**, 687-690 (1976).
- 9) Matsubara, S., Suzuki, F., and Ishida, N.: Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK-432. Cancer Immunol. Immunother., **6**, 41-45 (1979).
- 10) Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Kawade, Y., and Ishida, N.: Induction of interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of streptococcus pyogenes. Cell. Immunol., **68**, 187-192 (1982).
- 11) Toh, K., and Kikuchi, K.: Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages from rat treated with a streptococcal preparation, OK-432. Gann, **67**, 115-119 (1976).
- 12) 溝口靖紘・筒井ひろ子・阪上吉秀・東森俊博・門奈文之・山本祐夫・森沢成司: OK-432 によって活性化されたマウス腹腔浸出細胞の腹水肝癌細胞(MH134)に対する細胞障害性. 日本臨床免疫学会会誌, **5**, 281-286 (1982).
- 13) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F., and Okumura, K.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. J. Nat. Cancer Inst., **65**, 1265-1269 (1980).
- 14) 越村三郎・西田信義・板東勲・正印達・南幹雄・角野光司: 制癌に関する実験的研究, 第26報. streptolysin-O のみの産生能を有する溶連菌の無効性について, 金大結核年報, **23**, 61-66 (1965).
- 15) Bernheimer, A. W.: Formation of a bacterial toxin (streptolysin S) by resting cells. J. Exp. Med., **90**, 373-392 (1949).
- 16) Shirahata, T., and Shimizu, K.: Production and properties immune interferon from spleen cell cultures of toxoplasma infected mice. Microbiol.

Immunol., 24, 1109-1120 (1980).

- 17) Brodeur, B. R., Weinstein, Y., Melmon, K. L., and Merigan, T. C.: Reciprocal changes in interferon production and immune responses of mouse spleen cells fractionated over columns of insolubilized conjugates of histamine. *Cell. Immunol.*, 29, 363-372 (1977).
- 18) Koi, M., Saito, M., Ebina, T., and Ishida, N.: Lactate dehydrogenase-elevating agent is responsible for interferon induction and enhancement of natural killer cell activity by inoculation of ehrlich ascites carcinoma cells into mice. *Microbiol. Immunol.*, 25, 565-574 (1981).
- 19) Welsh, R. M., and Doe, W. F.: Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. Natural killer cell activity in cultured spleen leukocytes concomitant with T cell-dependent immune interferon production. *Infect. Immun.*, 30, 473-483 (1980).
- 20) Langford, M. P., Weigent, D. A., Georgiades, J. A., Johnson, H. M., and Stanton, G. J.: Antibody to staphylococcal enterotoxin A-induced human immune interferon (IFN γ). *J. Immunol.*, 126, 1620-1623 (1981).
- 21) Osborne, L. C., Georgiades, J. A., and Johnson, H. M.: Classification of interferon with antibody to immune interferon. *Cell. Immunol.*, 53, 65-70 (1980).
- 22) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S., and Shimizu, R.: Experimental anticancer studies. Part XXX. Factors influencing the streptolysin S-forming ability of streptococci having anticancer activity. *Japan J. Exp. Med.*, 36, 161-174 (1966).
- 23) Uchida, T., and Hoshino, T.: Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with malignant disease. *Cancer*, 45, 476-489 (1980).
- 24) 斎藤元男・山口高弘・青沼悦子・野田哲夫・海老名卓三郎・石田名香雄: OK-432の抗腫瘍効果(1)-OK-432誘起インターフェロン- γ (IFN γ)の抗腫瘍効果-. *癌と化学療法*, 9, 2031-2037 (1982).
- 25) 海老名卓三郎・斎藤元男: 免疫療法(免疫強化療法)インターフェロン. *免疫と疾患*, 5, 75-84 (1983).
- 26) Stewart, M. W., and Stewart, W.: Determination of human leukocyte populations involved in production of interferons alpha and gamma. *J. Interferon Research*, 1, 233-244 (1981).

- 27) 海老名卓三郎: 新インターフェロン誘起剤. 蛋白・核酸・酵素, 25, 81-91 (1981).
- 28) Wietzerbin, J., Stefanos, S., Falcoff, R., Lucero, M., and Falcoff, E.: Immune interferon induced by phytohemagglutinin in nude mouse spleen cells. *Infect. Immun.*, 21, 966-972 (1978).
- 29) 山口高弘・斎藤元男・黒田洋子・海老名卓三郎・石田名香雄・星野文彦・川出由巳: Streptococcus faecalis preparation, TH69が誘起するIFNの特性とその生物活性. *癌と化学療法*, 9, 1609-1616 (1982).
- 30) Wussow, P., Chen, Y. S., Stewart, M. W., and Stewart, W. E.: Induction of human γ -interferon in lymphoid cells by staphylococcus enterotoxin B: Partial purification. *J. Interferon Research*, 2, 11-20 (1982).
- 31) McCool, R. E., Cataloma, W. J., Langford, M. P., and Ratliff, T. L.: Induction of human gamma interferon by protein A from staphylococcus aureus. *J. Interferon Research*, 1, 473-481 (1981).
- 32) Stewart, M. W., Irwin, L. L., Braude, I. A., and Stewart, W. E.: Production, partial purification and characterization of human and murine interferons-Type II. *Mol. Immunol.*, 17, 625-633 (1980).
- 33) Margolis, S. A., and Levy, H. B.: The action of poly In \cdot Cn on the RNA metabolism of cultured cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 173, 339-345 (1970).
- 34) Flikke, M., Kjeldberg, E., and Lahelle, O.: Interference with cell viability and poliovirus multiplication by polyinosinic-polycytidylic acid. *J. Gen. Virol.*, 9, 111-117 (1970).
- 35) Stewart, W. E., Gosser, L. B., and Lockhart, R. E.: Distinguishing characteristics of the interferon responses of primary and continuous mouse cell cultures. *J. Gen. Virol.*, 13, 35-50 (1971).
- 36) 石田名香雄・斎藤元男: 癌とBRM, 第1版. 173-192頁, 東京. サイエンスフォーラム社, 1982.
- 37) Wheelock, E. F.: Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 169, 310-311 (1965).
- 38) 杉山正夫・山本馨・林喜博・木村修平・渡辺正男・柴田忠男: 扁桃より分離されたリンパ球のインターフェロン産生能について, 日本耳鼻咽喉科学会会報, 75, 1066-1067 (1972).
- 39) Klimpel, G. R., Day, K. D., and Lucas, D. O.: Differential production of interferon and lympho-

toxin by human tonsil lymphocytes. Cell. Immunol., 20, 187-196 (1975).

40) Youngner, J. S., and Salvin, S. B.: Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. J. Immunol., 111, 1914-1922 (1973).

41) Valle, M. J., Jordan, G. W., Haahr, S., and Merigan, T. C.: Characteristics of immune interferon produced by human lymphocyte cultures compared to other human interferons. J. Immunol., 115, 230-233 (1975).

42) Stewart, W. E., Blalock, J. E., Burke, D. C., Chany, C., Dunnick, J. K., Falcoff, E., Friedman, R. M., Galasso, G. J., Joklik, W. K., Vilceck, J. T., Youngner, J. S., and Zoon, K. C.: Interferon nomenclature. J. Interferon Research, 1, 5-6 (1981).

43) Fleischmann, W. R., Georgiades, J. A., Osborne, L. C., and Johnson, H. M.: Potentiation of interferon activity by mixed preparations of fibroblast and immune interferon. Infect. Immun., 26, 248-253 (1979).

44) Evans, S. R., and Johnson, H. M.: The induction of at least two distinct types of interferon in mouse spleen cell cultures by *Corynebacterium parvum*. Cell. Immunol., 64, 64-72 (1981).

45) Wakasugi, H., Kasahara, T., Minato, N., Hamuro, J., Miyata, M., and Morioka, Y.: In vitro potentiation of human natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. Interferon and interleukin-2 participation in the stimulation with OK-432. J. Nat. Cancer Inst., 69, 807-812 (1982).

Effect of Hemolytic Streptococci on Induction of Interferon in Mouse Spleen Cells Shusho Ikeda, Department of Orthopedic Surgery, (Director: Prof. S. Nomura), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., 92, 423-433 (1983)

Key words: Hemolytic streptococci, OK-432, Interferon, Anti-interferon α - β serum.

Abstract

The present study was undertaken to examine the correlation between the streptolysin S (SLS) -producing and interferon (IFN) -inducing abilities of *Streptococcus haemolyticus*, by using strains C203S, Blackmore and Su with both of anticancer- and SLS-producing abilities, and a strain C203U without either of the abilities. Lyophilized preparations of these streptococci were obtained according to the procedure that was used in the preparation of OK-432: each coccus suspension in Bernheimer's basal medium containing penicillin G was incubated at 37°C for 20 minutes, then at 45°C for 30 minutes and lyophilized. The abilities of these preparations to induce IFN in spleen cells of BALB/c mouse were assayed by using L929 cells and vesicular stomatitis virus. The results obtained were as follows. All preparations of C203S, C203U and Blackmore caused induction of IFN approximately to the same levels as that of OK-432, Su coccal preparation. The induced IFNs were not different in their activities. Any of heat-killed cocci except Su coccus cells did not cause the induction of IFN. The most potent IFN was obtained when a mixture of 1 ml of 1×10^7 spleen cells/ml and 0.1 ml of coccal suspension at the concentration of 0.5 or 0.1 KE/ml was incubated at 37°C for 24 to 48 hours in the CO₂ incubator; 1 KE corresponds to 0.1ml of dried cocci. When the induced IFNs were kept at pH 2 for 3 hours, the activities of IFNs were completely inactivated, although OK-432-induced IFN possessed weak activity (10 U/ml). On the other hand, the activities of induced IFNs were partially neutralized by anti-IFN α - β serum; more than 60% of the activities remained after neutralization. It was supposed that IFNs induced by coccal preparations contained IFN α , β and γ .